

اصول سنجش کلسیم و فسفر

کلسیم (Ca^{2+}):

این عنصر فراوان‌ترین عنصر معدنی در بدن می‌باشد. مقدار آن در افراد بالغ در حدود ۱۲۰۰-۱۰۰۰ گرم می‌باشد. ۹۸٪ آن به صورت هیدروکسی آپاتیت در استخوانها موجود بوده و مابقی در بخشهای دیگر بدن حضور دارد. یعنی ۱ درصد آن در مایعات خارج سلولی و ۱ درصد در سایر بافتها (از جمله عضلات) وجود دارد. کلسیم موجود در استخوانها به صورت املاح نامحلول فسفات و بیکربنات می‌باشد علاوه بر نقش آن در استحکام استخوان، در انعقاد خون، هدایت عصبی، عضلانی، قابلیت تحریک عضلات اسکلتی، کارکرد طبیعی قلب، در تنظیم فعالیت‌های ترشحی غدد درون ریز و برون ریز و فرآیند انتقال پیام هورمونی در داخل سلول و ... نقش دارد. تراز مثبت (تعادل مثبت) Ca^{2+} در نوزادان، کودکان، در فعالیتهای عضلانی و در بانوان (در هنگام بارداری و شیردهی) وجود دارد. همچنین جفت، جنین و غدد پستان در هموستاز آن دارای نقش می‌باشند. در دوران پیری و در بیماریهای مختلف، تعادل کلسیم منفی گشته و میزان دفع آن بیش از جذب خواهد بود.

تنظیم مقدار آن در بدن به صورت دقیق و به وسیله نوعی سیستم چند عضوی (کبد، پوست، کلیه، استخوان و روده) و چند هورمونی (هورمون پاراتورمون PTH، ۱۲۵ و ۱-دی‌هیدروکسی‌کله‌کلیسفرول و کلسیتونین) صورت می‌گیرد. کلسیم در خون به سه شکل عمده دیده می‌شود. تقریباً ۵۰ درصد از کلسیم تام خون به شکل یونیزه، ۴۵ درصد آن به شکل متصل به پروتئین، به ویژه آلبومین و ۵ درصد از آن به صورت کمپلکس با آنیونهای مانند فسفات و سیترات و ... دیده می‌شود.

تنها شکل یونیزه آن (Ca^{2+}) از لحاظ فیزیولوژیک فعال می‌باشد. محرک اصلی جذب کلسیم از روده باریک ویتامین D و تا حدودی PTH و نیز هورمون رشد و رژیم غذایی پرپروتئین و اسیدی بودن محیط روده می‌باشد. جذب یون کلسیم از روده تحت تأثیر فیتات (حاصل از اسیدفیتیک غلات و حبوبات)، فسفات و اگزلات و اسیدهای چرب قرار گرفته و مختل می‌گردد. دفع مقادیر عمده‌ای از آن از طریق ادرار صورت می‌گیرد هر چند دفع آن از طریق مدفوع با مقدار آن در رژیم غذایی مرتبط می‌باشد.

پاراتورمون (PTH):

پاراتورمون (PTH) یکی از هورمونهای تنظیم کننده غلظت Ca^{2+} در مایعات خارج سلولی می‌باشد. کاهش سطح کلسیم پلاسما باعث آزاد شدن PTH می‌گردد. این هورمون به طرق مختلف باعث افزایش میزان Ca^{2+} یونیزه در سرم می‌گردد:

۱. با اتصال به گیرنده‌های سطح سلولهای کلیوی و نهایتاً تأثیر بر لوله‌های ادراری باعث اثر بر باز جذب کلسیم می‌گردد.

این هورمون در لوله‌های پروگزیمال باعث کاهش باز جذب فسفات، کلسیم Ca^{2+} و بیکربنات (HCO_3^-) می‌گردد، ولی

اثر آن بر بخش انتهایی لوله‌های کلیوی، افزایش بازجذب کلسیم می‌باشد (اثر سریع PTH).

۲. با تأثیر بر سلولهای کلیوی سازنده ۱۲۵-دی هیدروکسی کله کلسیفرول و افزایش سنتز این ترکیب (شکل فعال ویتامین D) باعث افزایش غیرمستقیم کلسیم می‌گردد که این اثر مربوط به تأثیر ویتامین مذکور بر سلولهای مخاط روده می‌باشد.

۳. با اتصال به گیرنده‌های سطح سلولهای استخوانی و با تحریک استئوکلاستها باعث انحلال استخوان و آزاد شدن کلسیم می‌گردند. (بزرگترین تأثیر هورمون PTH).

پس به طور خلاصه (نتیجه نهایی اثر PTH):

- کاهش دفع کلسیم از کلیه‌ها و افزایش کلسیم در سرم.
- کاهش باز جذب فسفات از لوله‌های ادراری و کاهش فسفات سرم.
- تحریک سنتز کلیوی ویتامین D فعال، افزایش جذب روده‌ای کلسیم و افزایش کلسیم سرم.
- آزاد شدن کلسیم از استخوانها، در صورت تداوم ایجاد پوکی استخوان، تخریب ماتریکس استخوان، تجزیه ماده زمینه‌ای که نتیجه آن آزاد شدن پرولین و هیدروکسی پرولین می‌باشد.
- وقفه در باز جذب HCO_3^- ، Na^+ ، K^+ و اسیدهای آمینه از لوله‌های ادراری.
- افزایش دفع کلیوی کلسیم در صورت تداوم هیپرکلسمی (اثر متضاد با اثر اول).

ویتامین D:

این ویتامین نیز نقش مهمی در هموستاز کلسیم در سرم بازی می‌نماید. شکل غیرفعال آن که حاصل تأثیر UV در پوست بر ترکیباتی مانند ۷-دهیدروکلیسترول و یا ارگوسترول می‌باشد به دو صورت ویتامین D_2 و D_3 وجود دارد که تنها در ساختار زنجیره جانبی با همدیگر تفاوت دارند. هیدروکسیلاسیون این ویتامینها در کبد و کلیه عمده‌تاً صورت می‌گیرد.

در کبد هیدروکسیلاسیون در جایگاه ۲۵ صورت گرفته و ایجاد ۲۵-هیدروکسی-ویتامین D (D_2 یا D_3) می‌نماید. سپس ترکیب مذکور به کلیه‌ها منتقل گردیده و هیدروکسیلاسیون بر روی کربن شماره ۱ نیز صورت گرفته و ایجاد شکل فعال ویتامین D را می‌نماید. تولید آن تحت تأثیر و تنظیم فیدبکی (فیدبک منفی) بوده و همچنین هورمون پاراتورمون و فسفات سرم نیز بر آن مؤثر می‌باشد. افزایش غلظت ویتامین D فعال باعث مهار آنزیم $1-\alpha$ -هیدروکسیلاز می‌گردد (متابولیت عمده ویتامین D در پلاسما از نوع ۲۵-هیدروکسی ویتامین D می‌باشد). آثار فیزیولوژیک آن به طور عمده عبارت است از:

- افزایش جذب کلسیم و فسفر از روده.
- افزایش باز جذب از بخش انتهایی لوله‌های ادراری.
- افزایش کلسیم یونیزه و نیز کلسیم تام و فسفات پلاسما.
- افزایش تحلیل (Resorption) کلسیم از استخوانها با واسطه PTH و نیز تشدید تمایز استئوکلاستها.

کلسیتونین (Calcitonin) :

این هورمون از سلولهای پارافولیکولار (مجاور فولیکولی) در غده تیروئید سنتز می‌گردد و یک هورمون پپتیدی می‌باشد. این هورمون تحت تأثیر بسیاری از هورمونهای دستگاه گوارش (علاوه بر تأثیری که افزایش کلسیم بر ترشح آن دارد) افزایش می‌یابد و باعث کاهش باز جذب توبولی (در کلیه‌ها) Ca^{2+} و فسفات می‌گردد (به همراه کاهش باز جذب Na^+ ، K^+ و Mg^{2+}). این هورمون باعث جذب کلسیم توسط استخوان می‌گردد (Bone formation).

هیپرکلسمی (Hypercalcemia) :

در موارد متعددی ممکن است میزان کلسیم سرم تغییر نماید. مهمترین این عوامل عبارتند از :

- **هیپرپاراتیروئیدیسم اولیه و ثانویه** که می‌تواند منجر به نارسایی حاد و مزمن کلیه و استئومالاسی گردد. افزایش

کلسیم پلاسما خود عامل اختلال در عملکرد کلیه بوده و دفع بیش از حد آن از نفرونها به رسوب کلسیم به صورت سنگهای ادراری (نفروکلسینوز) منجر می‌گردد. در هیپرپاراتیروئیدیسم کلسیم یونیزه نیز (علاوه بر کلسیم تام) افزایش می‌یابد.

(هیپرپاراتیروئیدیسم اولیه به علت نوعی آدنوم فعال پاراتیروئید یا هیپرپلازی پاراتیروئید و تولید نابجای PTH می‌باشد و هیپرپاراتیروئیدیسم ثانویه در مبتلایان به نارسایی پیشرونده کلیه دیده می‌شود).

- **تومورهای بدخیم** به ویژه سرطانهای ریه و پستان (به علت متاستازهای استخوانی و نیز به علت ترشح PTH)،

سرطان کلیه، لنفوما و مالتیپل میلوما، که ممکن است عوامل هومورال و فاکتورهای فعال کننده استئوکلاست‌ها را آزاد نموده و باعث افزایش میزان کلسیم و فسفات گردند.

- **بیماری گرانولوماتوز مانند** : سل (توبرکولوز).

- **بیماری اندوکراین** مانند : هیپرتیروئیدیسم، سندرم کوشینگ، آکرومگالی و نیز تورمویهای اندوکراین. در

هیپرتیروئیدیسم (که همراه است با هیپرکلسی اوری، هیپرفساتمی و افزایش آلکالن فسفاتاز و گاهی با هیپرکلسمی)، افزایش تیروکسین باعث افزایش باز جذب استخوانی کلسیم و کاهش PTH و Vit D می‌گردد.

- **در آکرومگالی** افزایش هورمون رشد باعث افزایش جذب روده‌ای کلسیم و فسفر و افزایش باز جذب کلیوی کلسیم و فسفر می‌گردد.

- **در سندرم کوشینگ** افزایش گلوکوکورتیکوئیدها (مانند کورتیزول) باعث کاهش جذب روده‌ای و کاهش باز جذب

(نقص باز جذب) کلیوی می‌گردد که این امر باعث افزایش PTH و افزایش باز جذب استخوانی و نهایتاً افزایش کلسیم خون می‌گردد.

- **داروها** : مسمومیت با ویتامین D، ترکیبات دیورتیک و هورمونها.

- هیپرکلسمی کاذب : که به علت استاز وریدی (Stasis) ، بستن طولانی مدت تورنیکه یا گارو ، افزایش پروتئین سرم و دهیدراتاسیون ایجاد می گردد .
- در هیپوآلبومینمی : که میزان کلسیم یونیزه افزایش می یابد (ولی غلظت کلسیم تام پلاسما کاهش می یابد).
- در افزایش پروتئینهای سرم (هیپرپروتئینمی) ، اتصال کلسیم به آنها افزایش یافته و در نهایت غلظت کلسیم تام سرم افزایش می یابد .
- در اسیدوز تحت تأثیر کاهش PH ، شکل یونیزه کلسیم افزایش می یابد (به علت کاهش اتصال کلسیم به پروتئین ها) .
- در بیماریهای استخوانی از جمله بیماری پژه .

هیپو کلسمی (Hypocalcemia) :

کاهش کلسیم سرم که با علائم تتانی همراه می باشد در موارد زیر ممکن است ایجاد گردد :

- هیپوپاراتیروئیدیسم اولیه (ناشی از تخریب خود ایمنی غده ها) و ثانویه (برداشت تصادفی یا آسیب غدد در جریان جراحیهای گردن) و یا کاذب (به علت مقاومت عضو هدف به اثرات پاراتورمون) . که علائم بیوشیمیایی آن کاهش کلسیم و افزایش فسفات سرم می باشد .
- کمبود ویتامین D و سندرم های سوء جذب و یرقانه های انسدادی .
- آسیب کلیوی .
- راشیتیس و وابسته به ویتامین D .
- هیپوآلبومینمی (کاهش پروتئین های پلاسما از معمول ترین علل کاهش کلسیم تام پلاسما می باشد) .
- کاهش دریافت کلسیم و فسفات و ویتامین D .
- در اواخر دوران بارداری .
- در نوزادان .
- هیپو کلسمی کاذب (به علل : هیپوآلبومینمی ، رقت خون ، افزایش سدیم) .
- افزایش pH (آلکالوز) باعث کاهش کلسیم یونیزه و افزایش اتصال آن به پروتئین می گردد .

روشهای سنجش کلسیم (تام و یونیزه) :

به طور کلی این روشها را می توان به چند گروه تقسیم بندی نمود :

- روشهای تیتراسیون اکسایش - کاهش .
- روشهای رنگ سنجی .
- اسپکتروفتومتری جذب اتمی یا AAS (Atomic Absorption Spectrophotometry) .
- استفاده از الکترودهای انتخابگر یون یا ISE (Ion Selective Electrode) .
- استفاده از تترا متیل مورکساید (Tetra methyl murexide) جهت سنجش کلسیم یونیزه .

روش تیتراسیون کلارک - کالپ :

در این روش ابتدا با افزودن آنیون اگزالات ، اگزالات کلسیم به صورت رسوب (با توجه به غلظت کلسیم در نمونه) ظاهر می گردد . پس از جداسازی آن و اسیدی کردن نمونه ، اسید اگزالاتیک از Ca^{2+} آزاد می گردد . تیتراسیون اسید اگزالاتیک با پرمنگنات پتاسیم منجر به بیرنگ شدن آن می گردد (MnO_4^- به Mn^{2+} تبدیل می گردد) .

روش دیل - الینگبو :

در این روش از معرف فلئوئورسان کالسئین (Calcein) استفاده می گردد. در محیط قلیایی قوی کلسیم سرم با کالسئین ایجاد کمپلکس نموده که در نور UV تولید فلئوئورسان زرد - سبز می نماید . میزان EDTA لازم برای شکستن این کمپلکس معادل مقدار کلسیم سرم می باشد . ترکیبات تداخل کننده در این روش شامل : کلسیم ، آهن ، روی و ترکیباتی مانند : هپارین و استیل سالیسیلیک اسید (ASA) می باشد .

سرم باید بدون همولیز باشد و از نور UV در طول موج ۳۶۰ nm استفاده شود .

روش اورتوکرزول فتالئین (کمپلکسومتری) :

در این روش از معرف اورتوکرزول فتالئین استفاده می گردد . این روش مبتنی بر تشکیل کمپلکس رنگی بین معرف و کلسیم می باشد واکنش در محیط قلیایی صورت می گیرد و میزان جذب محلول رنگی (بنفش) به روش اسپکتوفتومتری (۵۷۰ nm) مورد سنجش قرار می گیرد . برای حذف تداخل مربوط به بعضی از عناصر یا یونها دیگر (مانند منیزیم) از ترکیبی به نام ۸-هیدروکسی-کینولین استفاده می گردد .

می توان به جای اورتوکرزول فتالئین از معرف های دیگری مانند : آلیزارین و آرسنازول III استفاده نمود که در این صورت تداخل

منیزیم در این روشها وجود ندارد . روشهای کمپلکسومتری از رایجترین روشهای اتوماتیک محسوب می گردند .

استفاده از اسیدکلروآنیلیدیک ؛

با افزودن اسید کلروآنیلیدیک که یک ترکیب رنگی می‌باشد ، رسوب کلرآنیلات کلسیم تشکیل می‌گردد . بعد از جداسازی رسوب ، افزودن EDTA باعث جدا شدن کلسیم از رسوب و اتصال آن به EDTA می‌گردد . در این صورت اسید کلروآنیلیدیک مجدداً تشکیل می‌گردد (رنگ قرمز - بنفش) که با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قابل سنجش می‌باشد . در این روش نیز Mg^{2+} به عنوان مهمترین عامل مزاحم محسوب شده و با افزایش pH محیط ، به صورت $Mg(OH)_2$ رسوب می‌نماید و از محیط واکنش حذف می‌گردد.

اندازه‌گیری کلسیم آزاد (یونیزه) :

برقرار بودن تعادل میان کلسیم یونیزه و کلسیم متصل به پروتئین موجود در سرم (در تمام مراحل آزمایش) شرط لازم جهت اندازه‌گیری Ca^{2+} (کلسیم یونیزه) می‌باشد . از الکترودهای اختصاصی یا انتخابگر یون (Ion Selective Electrode) ISE و یا از ترکیباتی مانند تترا متیل مورکساید (Tetra methyle murrexide) می‌توان استفاده نمود.

محاسبه کلسیم آزاد (یونیزه) :

بعضی از متخصصین بیوشیمی میزان کلسیم آزاد (یونیزه) سرم را برابر کلسیم مایع نخاع می‌دانند (۴/۲-۵/۵ mg/dl) و معتقدند که تنها کلسیم یونیزه می‌تواند وارد نخاع گردد . با این حال میزان کلسیم آزاد (یونیزه) را می‌توان با داشتن میزان پروتئین تام سرم (بر حسب g/dl) و کلسیم تام سرم (بر حسب mg/dl) از رابطه زیر محاسبه کرد :

$$\text{میزان کلسیم یونیزه} = \frac{\text{پروتئین تام سرم} - \text{کلسیم تام سرم} \times 6}{6 + \text{پروتئین تام سرم}}$$

روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی یا AAS (Atomic Absorption Spectrophotometry) :

از مهمترین روشهای اندازه‌گیری کلسیم محسوب می‌گردد (روش مرجع) که برای سنجش کلسیم تام مورد استفاده قرار می‌گیرد. (در بخش جداگانه‌ای مورد بحث قرار گرفته است .

نکات مورد توجه در اندازه‌گیری کلسیم:

- ۱- استفاده از سرم و خون کامل بلامانع است .
- ۲- از پلاسما نباید استفاده نمود ، زیرا باعث کاهش Ca^{2+} یونیزه می‌گردد (از پلاسمای هیپارینه و ناشتا می‌توان استفاده نمود) .
- ۳- بستن طولانی مدت تورنیکه باعث افزایش کلسیم تام می‌گردد (به علت تغلیظ خون Hemoconcentration) .
- ۴- افزایش pH باعث کاهش کلسیم یونیزه می‌گردد (و بالعکس) .
- ۵- وضعیت درازکش یا خوابیده باعث کاهش کلسیم تام می‌گردد (در خوابیدن طولانی مدت به علت افزایش انتقال کلسیم از استخوان به جریان خون افزایش Ca یونیزه و تام دیده می‌شود) .

فسفات :

فسفر به اشکال فسفات غیرآلی و آلی در بدن حضور داشته و بطور وسیعی در بدن توزیع شده است و یکی از عناصر بسیار مهم به شمار می‌آید. در بدن بالغین در حدود ۶۰۰ گرم فسفر وجود دارد که در حدود ۸۵ درصد آن بصورت ترکیبات هیدروکسی‌آپاتیت در استخوانها موجود می‌باشد. باقیمانده فسفر بیشتر به صورت متصل با چربیها، پروتئینها، کربوهیدراتها و سایر مواد آلی است که در قالب فسفولیپید، اسیدهای نوکلئیک، نوکلئوتیدها، اجزای غشا و سیتوپلاسم سلولی و بالاخره ترکیبات مهم در ذخیره‌سازی و تبادل انرژی، نقش حیاتی دارند. پلاسما تقریباً حاوی ۲/۵-۴/۵ mg فسفات معدنی می‌باشد که به دو شکل آنیونی منووالان (H_2PO_4^-) و دی‌والان (HPO_4^{2-}) وجود دارد.

توزیع نسبی فسفر در بدن	
توزیع نسبی (%)	بافت
۸۵	اسکلتی
۱۵	بافت‌های نرم
کمتر از ۱٪	مایعات خارج سلولی
۶۰۰ gr	کل (Total)

تقریباً ۱۰٪ از فسفات سرم به پروتئین‌ها متصل می‌باشد. ۳۵٪ آن به صورت کمپلکس با Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^{+} می‌باشد و باقیمانده (۵۵٪) آن به شکل آزاد وجود دارد. استرهای فسفات آلی عمدتاً در درون عناصر سلولی خون وجود دارند. فسفات غیرآلی (معدنی) از اجزاء اصلی ترکیب هیدروکسی‌آپاتیت در استخوان می‌باشد، بنابراین نقش مهمی در ساختار اسکلت بدن

بازی می‌کند و همچنین فسفات را برای بخشهای داخل و خارج سلولی تأمین می‌نماید، فسفات همچنین دارای اعمال دیگری در سلولها می‌باشد. برای مثال نقش مهمی در تشکیل پیوندهای پر انرژی (ATP و ...) دارد نیز نقش در ساختارهایی مانند cGMP, cAMP, NADP و ... دارد.

فسفات همچنین از عناصر ضروری در ساختار فسفولیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و فسفوپروتئین‌ها و نیز در رونویسی ژن و رشد سلولی مورد نیاز می‌باشد. فسفات برای فعالیت بسیاری از سیستم‌های آنزیمی ضروری می‌باشد.

مصرف روزانه در بالغین به طور متوسط ۸۰۰-۱۰۰۰ میلی‌گرم در روز است. فسفر به وفور در مواد غذایی و به ویژه در شیر و مشتقات آن یافت می‌گردد و بخش عمده‌ای از آن با پدیده فعال وابسته به انرژی، از روده باریک جذب بدن می‌گردد. هورمون رشد و ویتامین D و نیز رژیم کم کلسیم، سبب تسهیل جذب آن شده و هورمون پاراتیروئید نیز بطور مستقیم (احتمالاً به واسطه ویتامین D) در جذب آن مؤثر است. دفع فسفر به طور طبیعی، اکثراً از طریق ادرار صورت می‌گیرد که بیشتر آن از گلومرولها فیلتر شده و بخش اعظم آن از لوله‌های ادراری باز جذب می‌گردد. هورمون پاراتیروئید اثر وقفه‌ای بر باز جذب آن دارد.

هموستاز فسفر نیز همانند کلسیم تحت تأثیر روده باریک و کلیه‌ها صورت گرفته و استخوان نقش ویژه‌ای را در آن به عنوان منبع ذخیره‌ای این می‌نماید. همچنین صرف غذا به میزان قابل توجهی غلظت فسفر سرم را تغییر می‌دهد. مصرف غذاهای غنی از فسفات، غلظت فسفر سرم را افزایش می‌دهد در حالی که مصرف غذاهای سرشار از کربوهیدرات سبب کاهش قابل توجه در غلظت آن می‌شود. در بالغین، طی دوران قاعدگی مقدار فسفر کمتر از حالت نرمال است.

هیپر فسفاتمی Hyperphosphatemia (افزایش فسفر سرم) :

الف - کاهش دفع کلیوی فسفات :

۱. کاهش میزان فیلتراسیون کلومرولی

- نارسایی حاد و مزمن کلیوی

۲. افزایش بازجذب توبولی

- هیپوپاراتیروئیدیسم

- هیپوپاراتیروئیدیسم کاذب

- آکرومگالی

ب - افزایش دریافت فسفات :

۱. دریافت خوراکی یا وریدی

۲. ترکیبات دارویی حاوی فسفات

ج - افزایش بار فسفات خارج سلولی :

۱. لیز (تخریب) سلولها :

- رابدومیولیز (تجزیه رشته‌های عضلانی مخطط همراه با ترشح میوگلوبین در ادرار)

- همولیز داخل عروقی

- درمان با داروهای کشنده (تخریب‌کننده) سلولی (Cytotoxic therapy)

- لوکمیا یا لوسمی

- لنفوم

۲. شیفت سلولی (Transcellular shift) :

- اسیدوز لاکتیک

- اسیدوز تنفسی

- کتواسیدوز دیابتی

د - بیماریهای استخوان :

- ترمیم شکستگی‌ها

- ضایعات متاستاتیک استخوان

- مالتیپل میلوما (به علت ایجاد فاکتور فعال‌کننده استئوکلاست)

- بیماری پاژه

هیپوفسفاتمی Hypophosphatemia (کاهش فسفات سرم) :

الف- دفع کلیوی فسفات :

۱. هیپرپاراتیروئیدیسم اولیه و ثانویه

۲. نقص‌های توبول کلیوی

- هیپوفسفاتمی خانوادگی

- سندرم فانکونی

ب- کاهش جذب روده‌ای فسفات :

۱. افزایش اتلاف فسفات

- استفراغ (Vomiting)

- اسهال (Diarrhea)

- آنتی‌اسیدهای متصل شونده به فسفات

۲. کاهش جذب :

- سندرم سوء جذب

- کمبود ویتامین D

ج- شیفت به درون سلول :

- گلوکز به صورت خوراکی یا داخل وریدی - مصرف زیاد

- انسولین

- آلكالوز تنفسی

اندازه‌گیری فسفر :

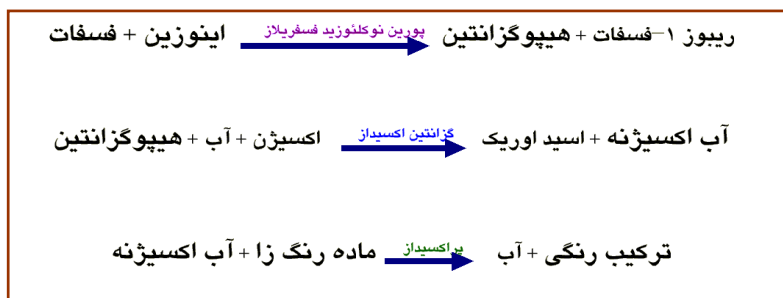
مبنای بسیاری از روشهای اندازه‌گیری فسفر ، ترکیب شدن معرفى به نام مولیبدات با فسفات (تحت شرایط بهینه) و تولید ترکیبات مختلفی از جمله فسفومولیبدات آمونیوم $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$ می‌باشد ، که می‌توان مقدار آن را مستقیماً در طول موج 340 nm (به عنوان روش اتوماتیک) اندازه‌گیری نمود که در این صورت برای افزایش حساسیت واکنش ، می‌توان فسفومولیبدات را به وسیله محلول گزین - ایزوبوتانل استخراج نموده و سپس در 310 nm سنجش را انجام داد .

روشی دیگر (که مبنای آن مشابه روش قبل می‌باشد) ، فسفومولیبدات ایجاد شده را تحت تأثیر احیاءکننده‌های مختلف دیگر مانند: کلرید قلع ، پارآمینونفتل سولفونیک اسید (ANSA) ، اسید آسکوربیک و یا سولفات آهن II قرار داده و مولبیدن آبی تشکیل

شده را مورد سنجش قرار می‌دهند . جهت حذف پروتئین (به عنوان عامل تداخلگر) می‌توان از تری کلرواستیک اسید (TCA) استفاده نمود . در روشی که از آهن II و ترکیبی به نام تیوره استفاده می‌گردد ، حساسیت روش و نیز ثبات رنگ ایجاد در واکنش روبرو افزایش یافته و می‌توان در محدوده وسیعی از غلظت‌ها سنجش را انجام داد (تبعیت از قانون بیر - لامبرت در محدوده وسیعی از غلظت‌ها) .

استفاده از مالاشیت تری فنیل متان سبز مبنای روشی دیگر است که در آن ، این ترکیب با فسفومولیبدات تشکیل شده در مرحله قبل (مطابق آنچه قبلاً گفته شد)

تشکیل کمپلکس رنگی می‌نماید که به عنوان یک روش بسیار حساس تلقی می‌گردد . اشکال این روش : اسیدیته بالای کمپلکس می‌باشد که باعث هیدرولیز فسفاتهای آلی می‌گردد و در نتیجه تداخل مثبت در واکنش‌ها ایجاد خواهد شد .



روش آنزیمی: در یکی از این روشها از

آنزیمهای پورین نوکلئوزید فسفریلاز ، گزانتین اکسیداز و پراکسیداز جهت سنجش فسفات استفاده می‌گردد (شکل روبرو) . همانگونه که در شکل دیده می‌شود محصول نهایی ترکیبی رنگی می‌باشد که

به روش فتومتری قابل سنجش می‌باشد. در روش آنزیماتیک دیگر که در شکل زیر دیده می‌شود ، فسفر تحت تأثیر واکنشهای متوالی توسط آنزیمهای گلیکوژن فسفریلاز ، فسفوگلوکوموتاز و گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز می‌گیرد . NADH تولید شده توسط روشهای

فلوریمتری یا اسپکتروفتومتری سنجیده می‌شود. واکنش در pH خنثی صورت می‌گیرد. از اینرو می‌توان فسفر غیر آلی را در حضور فسفاتهای آلی ناپایدار اندازه‌گیری کرد.



نمونه مورد نیاز و نکات مورد توجه در سنجش فسفات :

۱. برای سنجش فسفات بهتر است از نمونه سرمی استفاده گردد، هرچند می‌توان از پلاسمای هپارینه نیز استفاده نمود ولی در اینصورت سطح فسفات غیر آلی در حدود $0.3 - 0.2 \text{ mg/dl}$ پایین‌تر از سرم است.
۲. از ضد انعقادهایی مانند: سیتрат، اگزالات و EDTA نباید استفاده نمود، زیرا در تشکیل کمپلکس فسفومولیبدات تداخل می‌نماید.
۳. فسفات غیر آلی موجود در نمونه‌های خون تام (Whole blood) بسته به نوع نمونه، دما و دیوراسیون نمونه ممکن است به مرور زمان افزایش یا کاهش یابد، بنابراین بهتر است سرم یا پلاسما از اریتروسیتها جدا گردد.
۴. از نمونه‌های همولیز شده نباید استفاده نمود به علت اینکه اریتروسیتها حاوی غلظتهای بالایی از استرهای فسفات آلی می‌باشد که می‌تواند هیدرولیز شده و به فسفات معدنی تبدیل گردند.
۵. تداخل مربوط به نمونه‌های لیپمیک و ایکتریک (یرقانی) نیز مورد توجه می‌باشد.
۶. به علت تغییرات روزانه (Diurnal) فسفات سرم، نمونه‌های صبحگاهی و ناشتا پیشنهاد می‌گردد (مقدار فسفات سرم در هنگام بعد از ظهر و عصر بیشتر است).
۷. ظروف شیشه‌ای مورد استفاده باید بطور تمیز و صحیح شسته شود زیرا فسفات یکی از اجزای موجود در بعضی از دترژنتها می‌باشد.
۸. در صورت نگهداری سرم در دمای 4°C تا چندین روز می‌توان از آن استفاده نمود و در صورت فریز کردن تا چند ماه قابل استفاده است.
۹. در سنجش فسفات ادراری، نمونه ادرار باید در یک محیط اسیدی جمع‌آوری گردد (استفاده از ۲۰-۳۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۶ مولار برای ادرار ۲۴ ساعته).